UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ALLINE MARTINS RODRIGUES SANTOS

**Efeito das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de células monocíticas
humanas infectadas com *Leishmania (Leishmania) infantum***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientadora: Profª Dra. Hiro Goto

SÃO PAULO
2016

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Santos, Aline Martins Rodrigues

Efeito das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de células monocíticas humanas infectadas com *Leishmania (Leishmania) infantum* / Aline Martins Rodrigues Santos. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. MACRÓFAGOS. 2. LIPOPROTEÍNAS. 3. LEISHMANIA INFANTUM. 4. ARGININA. 5. FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE I.

USP/IMTSP/BIB-01/2017.

Aos meus amados pais, Luciana e Edson, aos meus irmãos, Allan e Halleson e ao meu querido companheiro Jean, sem vocês esse sonho acadêmico não teria se realizado!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por ter permitido que eu tivesse fé, coragem e saúde!

À Dra. Hiro em especial, pela paciência, pela orientação, pelos inúmeros ensinamentos, pela oportunidade me dada desde o início de tudo. Obrigada por confiar e ter acreditado em mim, professora!

À minha querida co-orientadora Chris, pelos finais de semana, pela paciência, por toda ajuda, meu eterno agradecimento nunca será suficiente para demonstrar o quão gratificante foi poder aprender com você. Obrigada pelas broncas e pela experiência de vida!

À Flaviane por ter me guiado no começo, por cada conselho, obrigada também por acreditar em mim!!

Aos professores, funcionários e alunos do IMT, Luiza, Eduardo, Orlando, Fernanda, Bia, Sandra, Prof^a Carmen, Mahyumi, Prof^a Angelo, Sandra, Edite, Mussya, Mariane, Kelly, Prof^a Thelma, Julio, Lídia, Wilson, Eliane, pelas dicas, conversas sem hora, por cada café da tarde, obrigada!

Aos meus amados pais, meu porto seguro, minha fonte de amor e carinho, minha força e meu incentivo eterno. Obrigada por acreditarem em mim, por terem me dado colo, inúmeros conselhos, sem vocês, com certeza essa jornada não teria sido possível.

Ao meu querido Jean, obrigada por ter me suprido com muito carinho e distração nos momentos necessários, pelo carinho, amor e dedicação.

Aos meus queridos irmãos Allan e Halleson por cuidarem de mim (até demais), pelo amor, pelas descontrações, por tudo!

À vida do meu afilhado Sebastian, mesmo sem entender, você me trouxe muita alegria, paz e amor, eu amo você!

Às minhas queridas amigas Daiane e Renata, pelo colo, pelo carinho, por toda ajuda, por que não apareceram antes?

Aos meus poucos e valiosíssimos amigos que tanto amo, Luiza, Maíra, Rafael, e Bia, obrigada pela força, amizade mesmo estando perto ou longe, vocês me ajudaram muito!

Aos meus queridos amigos Anderson e Marina, obrigada por cada conselho e cada ideia, vocês foram essenciais em cada momento!

Ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e ao programa de pós-graduação.

Ao laboratório de lípidos, em especial à Dra. Valéria por me ajudar com as ultracentrifugações, na banca de qualificação e por todo carinho em momentos difíceis.

Ao CNPq, CAPES e LIM 38 pelo apoio financeiro.

Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que tive oportunidade de conhecer e aprender de alguma maneira, e à todos que contribuíram para a conclusão desse trabalho!!!

“Deus nunca disse que a jornada da vida seria fácil. Ele simplesmente prometeu que valeria a pena.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

SANTOS AM. Efeito das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de células monocíticas humanas infectadas com *Leishmania (Leishmania) infantum* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* nas Américas que acomete células do sistema fagocítico mononuclear. Na doença ativa, ocorre redução nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumento nos níveis de colesterol total e triglicérides, sendo que a progressão da doença pode estar relacionada com essas alterações no nível de lipoproteínas. Desta forma, neste trabalho avaliamos: o efeito das lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e HDL no parasitismo de células de linhagem monocítica humana (THP-1) por *L. (L.) infantum*, a atividade da arginase e a expressão do mRNA do fator de crescimento insulina símile-I (“*insulin-like growth factor-I*” = IGF-I) e seu receptor (“*insulin-like growth factor-I receptor*” = IGF-IR). Células THP-1 foram infectadas por 6 h com promastigotas de *L. (L.) infantum*, na presença de 0,5% de soro com baixa concentração lipídica (infranadante) e na presença ou ausência das frações lipoprotéicas em diferentes concentrações. As células foram lavadas e mantidas depois em meio de cultura acrescido com infranadante por 24, 48 e 72 h. Quando as frações de VLDL e HDL foram adicionadas separadamente durante a incubação inicial o parasitismo aumentou em relação ao controle. Quando as frações de VLDL e HDL foram adicionadas concomitantemente houve diminuição do parasitismo em relação ao controle, mas aumento inesperado da atividade da arginase, nos períodos de 24 e 48 h. A expressão do mRNA de IGF-I e IGF-IR mostrou uma diminuição nas células infectadas na presença e ausência das frações em relação às células não infectadas. Os resultados obtidos sugerem um papel importante de VLDL e HDL na infecção de células THP-1 por *L. (L.) infantum*.

Descritores: Macrófagos. Lipoproteínas. *L. infantum*. Arginina. Fator de crescimento Insulin-like I.

ABSTRACT

SANTOS AM. Effect of plasma lipoproteins on the parasitism of human monocytic cells infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum* in Americas that affects cells of the mononuclear phagocytic system. During active disease reduction in high density lipoprotein (HDL) and increase in total cholesterol and triglyceride levels are observed. Thus in this study we evaluated the effect of very low density lipoprotein (VLDL) and HDL on the parasitism of cells of human monocytic line (THP-1) by *L. (L.) infantum*, the arginase activity and insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) mRNA expressions. THP-1 cells were infected for 6 h with *L. (L.) infantum* promastigotes in the presence of 0.5% low lipid concentration serum (infranatant) in the presence or absence of lipoprotein fractions at different concentrations. The cells were washed and then maintained in medium with infranatant for 24, 48 and 72 h. When VLDL and HDL were added separately the parasitism increased when compared with the control. When VLDL and HDL were added concomitantly the parasitism decreased in relation to the control but with unexpected increase in arginase activity. The evaluation of IGF-I and IGF-IR mRNA expression showed a decrease in the cells infected in the presence and absence of the fractions comparing with the uninfected cells. The results suggest an important effect of VLDL and HDL in the infection of THP-1 cells by *L. (L.) infantum*.

Key words: Macrophages. Lipoproteins. *L. infantum*. Arginine. Insulin-like growth factor-I.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Apo	Apolipoproteína
CAT-2B	<i>Cationic amino acid transporter – 2B</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IGF-I	<i>Insulin-like growth fator-I</i>
IGF-IR	<i>Insulin-like growth fator-I receptor</i>
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
LC	Leishmaniose cutânea
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NO	Óxido Nítrico
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PMA	<i>Phorbol-Myristate Acetate</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TG	Triglicérides
THP-1	Célula de linhagem monocítica humana
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Etapas de ultracentrifugação utilizadas para o isolamento das lipoproteínas.....	24
Tabela 2 - Sequência de Iniciadores utilizados na qPCR.....	28
Tabela 3 - Concentrações de lípidos e proteínas em Infranadante e Soro Total.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Curva de crescimento de formas progmastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em meio 199 completo.....	29
Figura 2 - Viabilidade de células THP-1 em meio RPMI 1640 suplementado com infranadante ou soro fetal bovino em diferentes concentrações.....	30
Figura 3 - Morfologia de células THP-1 em meio suplementado com 0,5% de SFB ou 0,5% de infranadante e adição de 100 µg/mL das frações de VLDL, LDL e HDL, após 72 h de incubação.....	31
Figura 4 - Parasitismo (média ± desvio padrão) de células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , nas proporções de parasito/célula de 5:1 e 8:1, com 8 h de infecção e diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 h) em meio RPMI 1640 suplementado com diferentes concentrações de infranadante ou SFB.....	32
Figura 5 - Parasitismo (média ± desvio padrão) de células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , nas proporções de parasito/célula de 8:1 por 6 h e 8 h de infecção e diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 h) em meio RPMI 1640 suplementado com 0,5% de SFB ou 0,5% de infranadante.....	33
Figura 6 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito da lipoproteína VLDL em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em diferentes períodos de infecção.....	34
Figura 7 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito da lipoproteína HDL em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em diferentes períodos de infecção.....	35
Figura 8 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito da lipoproteína LDL em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em diferentes períodos de infecção.....	36
Figura 9 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito das lipoproteínas VLDL e HDL em diferentes concentrações (100 e 1000 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em diferentes períodos de infecção.....	37

Figura 10-	Razão do parasitismo em diferentes tempos em relação de células THP-1 infectadas com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na presença ou ausência das frações de VLDL e HDL.....	38
Figura 11-	Atividade da arginase em células THP-1 sem ou com infecção por promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , na ausência ou presença das frações de VLDL e HDL.....	39
Figura 12-	Expressão de mRNA de IGF-I em células THP-1 infectados com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> com ou sem adição de lipoproteínas VLDL e HDL em diferentes tempos de infecção.....	39
Figura 13-	Expressão de mRNA de IGF-IR em células THP-1 infectados com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> com ou sem adição de lipoproteínas VLDL e HDL em diferentes tempos de infecção.....	40

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Leishmanioses	15
1.2 Lipoproteínas	17
1.3 Alterações lipídicas na LV	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Células	23
3.2 Animais.....	23
3.3 Parasito, sua manutenção e cultura	23
3.3.1 Parasito.....	23
3.3.2 Manutenção de formas amastigotas e cultura de promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	23
3.4 Obtenções das frações lipídicas e do meio livre de lípidos (Infranadante de sangue total)	24
3.5 Dosagens de Colesterol, Triglicérides e proteínas das frações lipídicas e infranadante.....	25
3.6 Infecção de células THP-1 com formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>.....	25
3.7 Determinação do parasitismo	26
3.8 Avaliação da atividade da arginase na infecção de macrófagos por promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	26
3.9 Quantificação da expressão de mRNA de IGF-I e seu receptor	27
3.9.1 Extração de RNA total e obtenção do cDNA	27
3.9.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	27
3.10 Análise dos resultados	28
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	29
4.2 Concentração de lípidos no infranadante.....	29
4.3 Viabilidade de células THP-1 em meio de cultura suplementado com infranadante e na presença das lipoproteínas	30

4.4 Padronização da infecção de células THP-1 com formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	31
4.5 Infecção das células THP-1 com <i>L. (L.) infantum</i> na presença das lipoproteínas	33
4.6 Atividade da arginase nas células THP-1 infectadas por promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na presença das lipoproteínas	38
4.7 Expressão do mRNA de IGF-I e seu receptor nas células THP-1 infectadas na presença das lipoproteínas	39
5 DISCUSSÃO	41
REFERENCIAS	46
ANEXO	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas doenças emergentes e re-emergentes, que apresentam um aumento na sua incidência nas últimas duas décadas (1). Esta doença está presente em 98 países e 90% dos casos ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil. A cada ano, a estimativa de novos casos em todo mundo de leishmaniose visceral (LV) é de 200.000 a 400.000 e de leishmaniose cutânea (LC) é de 700.000 a 1.200.000 (2).

Noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV na década de 1990 ocorriam na Região Nordeste do nosso país. À medida que a doença foi se expandindo para outras regiões e atingindo áreas urbanas e periurbanas essa situação foi se modificando e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já apresentava uma redução para 77% dos casos (3). Dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO)(3).

Quanto às características clínicas e a relação parasito-hospedeiro, as leishmanioses podem ser divididas em duas apresentações distintas: leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV). A forma tegumentar atinge a pele, causando diferentes manifestações clínicas: cutânea, mucosa, recidiva, disseminada e difusa. A forma visceral é a mais grave e atinge particularmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (4).

No Brasil, a LV é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (5), que atualmente é considerada ser *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (6), sendo o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* o seu principal vetor (7). A *Leishmania* é um parasito difásico que completa seu ciclo vital em dois hospedeiros: no inseto vetor e no hospedeiro mamífero (8). A transmissão ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectados, que abrigam

a forma promastigota, alongada, com flagelo externo, na luz do trato digestivo, sendo inoculados no hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Uma vez dentro dos hospedeiros mamíferos, as formas promastigotas são fagocitadas e os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada, sem flagelo externo. O flebótomo adquire as formas amastigotas ao ingerir as células infectadas durante o repasto sanguíneo e estas se transformam em promastigotas no intestino do vetor. Na manutenção do ciclo do parasito, o cão apresenta grande importância por representar o principal reservatório doméstico de *L. (L.) infantum*. Estes hospedeiros são altamente suscetíveis à infecção e apresentam intenso parasitismo cutâneo (9).

Na LV humana, o parasito é encontrado nas células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos como baço, fígado e medula óssea. O quadro clínico apresentado durante a infecção é bastante variável. No geral, os casos assintomáticos se caracterizam por sorologia positiva ou reação de hipersensibilidade tardia a antígenos de leishmânia, sem manifestação clínica da doença. Os oligossintomáticos apresentam febre baixa ou ausente, hepatomegalia, esplenomegalia discreta ou ausente, adinamia. Já os sintomáticos apresentam a manifestação plena da doença com febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e grande comprometimento do estado geral (10). Na fase ativa da LV são observadas alterações hematológicas como anemia, leucopenia, trombocitopenia com aumento das proteínas totais, da fração gama-globulina e diminuição da albumina. Há também alterações bioquímicas, destacando-se as alterações lipídicas, como diminuição nos níveis de lipoproteínas de alta densidade e aumento dos níveis de triglicérides e colesterol total (11).

O diagnóstico da LV pode ser feito por exame parasitológico que consiste na visualização do parasita em células da medula óssea (MO), baço, fígado e linfonodos. A detecção do parasito também pode ser feita por meio de técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, alternativamente, são realizados testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-leishmânia, utilizando a reação de imunofluorescência indireta ou a reação imunoenzimática (“enzyme-linked immunosorbent assay”= ELISA) e mais recentemente, teste rápido imunocromatográfico com antígeno recombinante rK39 (12).

1.2 Lipoproteínas

As lipoproteínas são partículas constituídas por triglicérides (TG), colesterol esterificado, fosfolípidos, colesterol livre e vitaminas lipossolúveis envoltas pela apolipoproteína. De acordo com sua origem, composição, densidade e tamanho, as lipoproteínas podem ser classificadas em: quilomícron, lipoproteína de muito baixa densidade (“very low density lipoprotein” = VLDL); lipoproteína de baixa densidade (“low density lipoprotein” = LDL); lipoproteína de densidade intermediária (“intermediate density lipoprotein” = IDL) e lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein” = HDL) (13). Os quilomícrons e as VLDL apresentam predominantemente TG em sua constituição e proporcionalmente pouco fosfolípidos e proteína, enquanto na outra ponta do espectro as HDL são as lipoproteínas que possuem maior proporção de fosfolípidos e proteínas e, portanto, menos TG e colesterol que as outras lipoproteínas (14).

Dentre as principais características das lipoproteínas, podemos citar:

- a) A VLDL é uma lipoproteína que contém colesterol, ésteres de colesterol e apolipoproteínas (Apo) (B-100, C-1, C-2, C-3 e E) (15), é formada no enterócito, e carrega lípidos da dieta e vitaminas lipossolúveis absorvidas no trato intestinal para o fígado e tecidos periféricos (16);
- b) A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma (17) e a principal transportadora de colesterol, responsável por cerca de 60 a 70% do transporte de colesterol total plasmático, sendo 75% esterificado (18). É removida da circulação mais lentamente que as outras lipoproteínas, sendo preferencialmente captadas pelo receptor de LDL de células em processo ativo de divisão ou por tecidos que utilizam colesterol na síntese de hormônios esteróides ou sais biliares (19);
- c) As HDL são sintetizadas no fígado e intestino ou a partir das lipoproteínas ricas em TG pela ação da lipoproteína lipase, na sua estrutura apresentam maior concentração de Apolipoproteína A-I e A-II. Elas são responsáveis pela remoção do excesso de colesterol das

células para o fígado e subsequente depósito para excreção na bile (20).

Para que as funções das lipoproteínas sejam exercidas adequadamente, existe um conjunto de proteínas que mantêm a sua estabilidade e solubilidade em meio aquoso (14). Estas proteínas são denominadas apolipoproteínas, que contribuem para a regulação do metabolismo das lipoproteínas por modularem a atividade de enzimas e interagirem com receptores celulares específicos e de alta afinidade (21). As principais apolipoproteínas são as ApoA, ApoB, ApoC, ApoD e ApoE (22).

O processamento de lipoproteínas ricas em TG pela lipoproteína lipase é o evento central do metabolismo lipídico. A hidrólise das lipoproteínas ocorre principalmente no coração, tecido muscular esquelético e tecido adiposo, gerando ácidos graxos e TG. Os ácidos graxos são utilizados como combustíveis no músculo estriado e o TG pode ser armazenado no tecido adiposo. Além disso, o processamento lipolítico também produz lipoproteínas remanescentes aterogênicas (por exemplo, LDL) e fornece lípidos para a biogênese de HDL (23).

1.3 Alterações lipídicas na LV

Na LV, as alterações lipídicas vêm sendo foco de estudo, uma vez que essas alterações são observadas com frequência tanto em humanos como em cães e em modelos experimentais. Uma das alterações inicialmente descritas foram os estudos de Bertoli et al. (1982) (24) em 28 pacientes com LV, que apresentavam hipertrigliceridemia e os de Bekaert et al. (1989) (25) que observaram também uma diminuição dos níveis plasmáticos de HDL, LDL, apoA-I e apoA-II, e uma diminuição de TG em 17 pacientes com LV na Tunísia.

Em outros estudos, também realizados em pacientes com LV, observou-se uma redução na concentração de HDL, um aumento marcante na concentração de TG e de colesterol total em crianças com LV (11). Liberopoulos et al. (2002) (26) observaram severa hipocolesterolemia, com redução na concentração de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, porém um aumento de TG. Há relatos de duas crianças com LV em que concentrações plasmáticas de HDL antes do tratamento estavam significativamente mais baixas, enquanto os níveis de triglicerídeos no

plasma estavam aumentados (27). Em estudo mais recente foram observados níveis circulantes elevados de TG e VLDL, e marcada redução dos níveis de colesterol total, LDL, HDL e ApoA, e uma modesta redução da ApoB em 26 pacientes com LV (28). Nieto et al. (1992) (29) desenvolveram um estudo no qual 16 cães infectados com LV apresentavam aumento nos níveis de TG, LDL, colesterol total e diminuição dos níveis de HDL no plasma. Durgut et al. (2012) (30) observaram em estudo com 10 cães infectados por LV que houve um aumento significativo dos níveis de colesterol total, VLDL e LDL, e por outro lado houve uma diminuição dos níveis de HDL e TG. Em modelo experimental, observou-se em soro de hamsteres um aumento de TG, após 60 dias de infecção por *Leishmania donovani* (31).

Os macrófagos são as células hospedeiras das *Leishmania sp.*, essenciais para o estabelecimento da infecção (32). Uma vez que possuem receptores para lipoproteínas naturais e/ou modificados, eles são possíveis alvos para atividades imunomodulatórias exercidas por essas lipoproteínas, dentre elas as lipoproteínas VLDL, LDL, HDL (33). Os principais receptores presentes nos macrófagos são os receptores de LDL (34) e o receptor *scavenger* para as partículas modificadas de LDL (35).

As lipoproteínas plasmáticas parecem ter um papel importante na defesa do hospedeiro, como um componente da resposta imune inata (36). Infecção e inflamação induzem uma resposta de fase aguda com várias alterações em lipídeos e metabolismo de lipoproteínas (37). As lipoproteínas podem se ligar e neutralizar um número vasto de DNA e RNA viral. VLDL e LDL, particularmente, protegem contra certos tipos de vírus, como togavirus e rabdovirus. HDL mostra uma atividade antiviral mais ampla (36). Em caso de protozoários, como o *Trypanosoma brucei*, foi observado que *trypanosome lytic fraction*, uma subfração da HDL nativa humana que contém proteínas relacionadas às haptoglobulinas, apolipoproteína L-I e apoA-I, protege contra infecção pelo trypanossomatídeos (38). Já foi demonstrado em infecções por *Leishmania* que a *trypanosome lytic fraction* inibe a infecção em camundongos transgênicos para essa molécula, pois a mesma pode causar danos diretamente ao parasito, por se acumular no fagolisossoma e ser ativada em condições ácidas (39).

Soares et al. (2010) (27) avaliaram *in vitro* o papel de LDL, HDL e VLDL plasmáticos em macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico, infectados por *Leishmania infantum*. A adição de LDL estimulou a produção de TNF- α nos macrófagos infectados sugerindo que a LDL possa influenciar no desenvolvimento da LV por esse mecanismo.

Pucadyil et al. (40) desenvolveram um estudo *in vitro* com macrófago murino depletados de colesterol em sua membrana plasmática. Após infecção com *Leishmania donovani*, verificou-se uma baixa infectividade nas células depletadas de colesterol e que a interação macrófago-parasita era reestabelecida com a suplementação de colesterol. Assim, demonstraram que o colesterol é importante para o desenvolvimento da infecção.

Um estudo que sugere um importante papel das lipoproteínas na infecção por *Leishmania* é o de Rosenzweig et al. (2008) (41), que mostraram diferenças no perfil metabólico de amastigotas e promastigotas, apontando para maior necessidade de proteína e lípidos na geração de energia em amastigotas quando comparadas a promastigotas.

Como dito anteriormente, os macrófagos são as células hospedeiras das *Leishmania sp.*, sendo essenciais para o estabelecimento ou não da infecção. Dependendo de como são ativados, os macrófagos podem favorecer a proliferação ou eliminação dos parasitos. Os produtos metabólicos da L-arginina possuem um papel importante nessas funções. A liberação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), pela oxidação da L-arginina catalisada por meio da sintase induzível do óxido nítrico (iNOS) são os principais mecanismos que geram produtos lesivos ao parasito em macrófagos de camundongos (42); (43);(44). Além disso, a partir da hidrólise da L-arginina pela arginase, enzima expressa em macrófago e também no parasito (45), são geradas poliaminas que são essenciais para o crescimento da *Leishmania* (46). Dessa forma, a arginase mostra-se importante na regulação da atividade de iNOS em macrófagos, modulando a concentração de L-arginina. Estudos mostraram que a indução de arginase leva a diminuição da produção de NO, interferindo no papel de defesa do macrófago (47).

Os fatores de crescimento insulina-símile (*insulin-like growth fator* = IGF) são polipeptídeos filogeneticamente bem preservados, com massa molecular de aproximadamente 7,5 kDa e que apresentam principalmente duas formas: IGF-I e IGF-II. São encontrados na circulação, nos tecidos e podem ser produzidos pela maioria das células, incluindo os macrófagos (48), e principalmente pelos hepatócitos. Esses fatores, em sua maioria encontram-se ligados às proteínas ligantes de IGF (*IGF-binding proteins* = IGF-BPs). Suas funções biológicas são mediadas pela interação com o receptor do IGF-I, dentre elas: proliferação e diferenciação celular (49). Em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo demonstraram que o IGF-I é um importante indutor da proliferação de promastigotas e amastigotas axênicas de diferentes espécies de *Leishmania* (50); (51); (52).

De acordo com o exposto, a alteração nos níveis das lipoproteínas durante a fase ativa da LV pode participar modulando a infecção por *Leishmania*. Neste trabalho avaliamos o efeito direto das frações de lipoproteínas no parasitismo de células por *Leishmania (L.) infantum*, a atividade da arginase e a expressão do mRNA de IGF-I e seu receptor em células de linhagem monocítica humana (THP-1) infectadas com *L. (L.) infantum*. A opção por essa linhagem celular, em detrimento a macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano, foi para contornar a inevitável variação de resposta destas células quando obtidas de doadores diferentes. Sabe-se ainda que as células THP-1, quando ativadas com “phorbol-myristate acetate” (PMA), expressam marcadores de superfície e um perfil de citocinas similares a macrófagos derivados de monócitos humanos (53).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos das diferentes frações de lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de células THP-1 infectadas por *Leishmania (L.) infantum*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o parasitismo nas células THP-1 infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*;
- b) Avaliar o papel das lipoproteínas no parasitismo nas células THP-1 infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*;
- c) Analisar a atividade da arginase nas células THP-1 infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na presença e ausência de lipoproteínas;
- d) Avaliar a expressão de mRNA do IGF-I e seu receptor nas células THP-1 infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na presença e ausência de lipoproteínas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células

Células da linhagem monocítica humana THP-1 (TIB-202 - ATCC - The Global Bioresource Center, USA).

3.2 Animais

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) não isogênicos, machos, com 45 a 60 dias de idade, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em ambiente com temperatura controlada, ração (Purina Brasil) e água à vontade. O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), sob o número 258 (Anexo A).

3.3 Parasito, sua manutenção e cultura

3.3.1 Parasito

Cepa *Leishmania (Leishmania) infantum* MHOM/BR/1972/LD (*syn chagasi*).

3.3.2 Manutenção de formas amastigotas e cultura de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

A manutenção da cepa de *Leishmania (Leishmania) infantum* foi realizada em hamsteres inoculando-se suspensão de homogeneizado de baço de hamster infectado a cada 3 – 4 meses.

Para o cultivo de *Leishmania*, formas amastigotas de *L. infantum* foram purificadas a partir do baço de hamster experimentalmente infectado, retirado assepticamente. O baço foi macerado em meio RPMI 1640 e a suspensão celular

passada em agulhas de diferentes calibres. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado sucessivamente por 3 vezes a 394 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante centrifugado a 788 x g por 30 minutos e o precipitado ressuspendido em meio 199 (Cultilab, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion, Brasil), 100 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de gentamicina, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 20 mg/mL de Hemina e 5% de urina humana (meio completo). As formas promastigotas foram obtidas a partir de cultura de formas amastigotas em meio 199 completo, mantidas em estufa a 26 °C, sendo utilizadas para infecção de células quando em fase estacionária de crescimento.

3.4 Obtenções das frações lipídicas e do meio livre de lípidos (Infranadante de sangue total)

As frações lipídicas (VLDL, LDL e HDL) foram obtidas por ultracentrifugação (Thermo Scientific Sorvall WX Ultra 100, rotor Fiberlite F50L, EUA), a partir de um *pool* de soro humano proveniente do sangue coletado de indivíduos saudáveis (54), de acordo com as condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Etapas de ultracentrifugação utilizadas para o isolamento das lipoproteínas

Fração Lipoprotéica	Rotação	Tempo de ultracentrifugação	Ajuste de densidade (d) com Brometo de potássio (KBr)
VLDL	100.000 x g	12 horas	-
LDL	100.000 x g	20 horas	1.063 mg/dL
HDL	100.000 x g	40 horas	1.210 mg/dL

Após obtenção, as frações LDL, HDL e o infranadante (soro com baixa concentração lipídica obtido após o isolamento das frações lipoprotéicas) foram dialisados em salina tamponada com fosfato, 0,01M, pH 7,2 (*phosphate-buffered saline* = PBS) para a remoção completa do KBr, sendo esterilizados por filtração e armazenadas a – 80 °C. O infranadante foi armazenado a – 20 °C.

3.5 Dosagens de Colesterol, Triglicérides e proteínas das frações lipídicas e infranadante

Alíquotas do soro total, infranadante, VLDL, LDL e HDL foram dosadas por método enzimático colorimétrico em analisador automático bioquímico Cobas Mira (F. Hoffman-La Roche, Basileia, Suíça), com kits Roche (Roche Diagnostics-Mannheim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A dosagem proteica foi realizada com reagente de Bradford (Sigma Aldrich, EUA) (55), usando Albumina Sérica Bovina como padrão, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Infecção de células THP-1 com formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

Células THP-1 foram plaqueadas em triplicatas na quantidade de 5×10^5 células por poço, sobre lamínulas estéreis (13 mm), em placas de 24 poços (JetBiofil, China) em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) com 5% de SFB e 20 ng/mL de *phorbol 12-myristate 13 acetate* (PMA), sendo incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas para adesão e diferenciação em macrófagos. As células não aderentes foram removidas por lavagens com PBS, pH 7,2 e as células aderentes foram mantidas por 48 h em meio RPMI 1640 com 5% de SFB.

Para infecção, a proporção de cinco ou oito parasitos (formas promastigotas) para uma célula foi utilizada, mantendo-os na cultura por 6 h ou 8 h em meio RPMI 1640 acrescido de diferentes concentrações de infranadante ou SFB (0,5%, 1% e 5%) na presença ou ausência das frações lipídicas em concentrações de 50, 100 e/ou 200 µg/mL. Após esse período, as células foram lavadas para a retirada dos parasitos não internalizados e o meio de cultura foi repostado, sendo incubadas por 24, 48 e 72 h. Nos resultados, o tempo final de infecção por 6 h será o tempo 0 h do experimento.

No tempo final do experimento, as células infectadas ou não foram processadas para a avaliação do parasitismo, da atividade de arginase e expressão de mRNA.

3.7 Determinação do parasitismo

Após os períodos de incubação, as placas foram retiradas e as lamínulas lavadas com PBS, sendo coradas com corante panótico (NewProv, Brasil) segundo instruções do fabricante. Posteriormente, as lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia com meio de montagem Permount (Fisher Scientific, EUA).

Para a determinação do parasitismo (número de amastigotas/100 células) 300 células por lamínulas foram contadas em microscópio óptico, com objetiva de 100X, sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Parasitismo/100 células} = \left[\frac{(\text{N}^\circ \text{ de parasitos})}{\text{N}^\circ \text{ de células infectadas}} \times \frac{(\text{N}^\circ \text{ de células infectadas})}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \right] \times 100$$

3.8 Avaliação da atividade da arginase na infecção de macrófagos por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

A atividade da arginase foi avaliada por meio da produção de ureia em lisado celular de células THP-1 infectadas com *L. (L.) infantum* após diferentes tempos de incubação, de acordo com Corraliza et al. (56). As células foram lisadas com 0,1% de Triton X-100 contendo inibidor de proteases (coquetel-P8340; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) (tampão de lise) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 mM de Cloreto de Manganês (MnCl_2) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 50 mM de Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) pH 7,4 foram adicionados para ativação da arginase, sendo incubados por 10 min a 55 °C. Após incubação, a hidrólise da arginina foi iniciada pela adição de 0,5 M de L-arginina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) pH 9,7, seguida de incubação a 37 °C por 45 min e a reação foi interrompida após a adição de uma solução contendo H_2SO_4 96% (Merk, Alemanha), H_3PO_4 85% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e H_2O na proporção 1:3:7. Em seguida, α -isonitrosopropiofenol (ISPF) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 9% em etanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi adicionado e as reações incubadas à 95 °C durante 45 min. Após leitura da absorbância a 540 nm no leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA), a concentração de

ureia produzida pelas amostras foi determinada por meio de uma curva padrão de ureia (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os resultados são apresentados com um de arginase/ 10^6 células, onde 1 unidade de arginase (mU) catalisa a formação de 1 μmol de ureia/min/ 10^6 células.

3.9 Quantificação da expressão de mRNA de IGF-I e seu receptor

3.9.1 Extração de RNA total e obtenção do cDNA

O RNA total das células infectadas ou não com *L. (L.) infantum* foi extraído a partir de 1×10^6 células/poço com o reagente TRIZOL (Invitrogen, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O RNA foi ressuspenso em água ultrapura livre de RNase e a dosagem foi realizada por espectrofotômetro NanoDrop ND-2000c (Thermo Scientific, EUA). A integridade das amostras mensuradas foi avaliada pela relação 260/280, onde os valores entre 1,8 a 2,0 foram considerados aceitáveis. Aproximadamente 1 μg de RNA total obtido foi utilizado para a obtenção dos cDNA das amostras com o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A expressão relativa do mRNA que codifica o fator de crescimento IGF-I e seu receptor foi avaliada por PCR quantitativa (qPCR) nas células infectadas ou não por *L. infantum*. A expressão do gene constitutivo β -actina foi utilizado como referência, segundo Pfaffl et al. (57). Os iniciadores empregados nas reações estão listados na Tabela 2. As reações foram realizadas com o sistema SYBR[®]Green, em volume final de 20 μL , compostas por: 1,5 μL de cDNA, 150 nM de cada um dos iniciadores, 10 μL do reagente SYBR[®]Green (2X) (Applied Biosystems, EUA) e água ultrapura. As amplificações foram realizadas no equipamento StepOne (Applied Biosystems, EUA), de acordo com os ciclos listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de Iniciadores utilizados na qPCR

Sequência	Ciclos: 40
IGF-I <i>Forward</i> 5'-CTGAGCTGGTGGATGCTCTTCA-3'	
IGF-I <i>Reward</i> 5'-GACTGCTGGAGCCATACCCTGT-3'	92 °C – 2 min
IGF-IR <i>Forward</i> 5'-GGTCTCTGAGGCCAGAAATGGA-3'	58 °C – 30 seg
IGF-IR <i>Reward</i> 5'-GGTCTCTGAGGCCAGAAATGGA-3'	70 °C – 30 seg
β -actina <i>Forward</i> 5'-AAAATCTGGCACCACCTTCTACA-3'	
β -actina <i>Reward</i> 5'-AAACATGATCTGGGTCATCTTCTCG-3'	

3.10 Análise dos resultados

A análise estatística foi realizada empregando-se o teste ANOVA e Tukey e todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Uma análise descritiva foi realizada para expor os resultados e a apresentação das variáveis mensuradas foi apresentada por meio de tabelas e gráficos, utilizando os softwares Excel 2013 e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento de promastigostas de *L. (L.) infantum*

Para determinarmos a fase estacionária de crescimento das formas promastigotas, uma curva de crescimento foi realizada a partir da cultura de formas amastigotas com contagens diárias no número de parasitos. Podemos observar na Figura 1 que a fase estacionária de crescimento das formas promastigotas foi alcançada no 7º dia de cultura.

Figura 1 - Curva de crescimento de formas progastigotas de *L. (L.) infantum* em meio 199 completo.

4.2 Concentração de lípidos no infranadante

Após a obtenção do infranadante por ultracentrifugação, o mesmo foi submetido a dosagem de colesterol total, triglicérides e proteína total para verificarmos se a redução dos componentes lipídicos ocorreu. Podemos observar que o infranadante apresentou uma redução na concentração tanto de colesterol quanto de triglicérides quando comparado ao soro total. Ao compararmos a concentração de proteínas, o infranadante apresentou uma ligeira redução (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações de lipídes e proteínas em Infranadante e Soro Total

Dosagem	Amostra	
	Infranadante	Soro Total
Colesterol (mg/dL)	2	193
Triglicérides (mg/dL)	4	183
Proteínas (mg/mL)	75,8	79,3

4.3 Viabilidade de células THP-1 em meio de cultura suplementado com infranadante e na presença das lipoproteínas

Para verificarmos se o crescimento e a manutenção das células THP-1 seriam viáveis na presença de um soro com baixa concentração de lipídeos, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com diferentes concentrações de infranadante (0,5%, 1% e 5%), como também de soro fetal bovino (SFB). Ao compararmos a viabilidade das células cultivadas tanto na presença de infranadante (Figura 2A) quanto na presença de SFB (Figura 2B), podemos observar que as menores concentrações de infranadante (0,5% e 1%) proporcionaram a maior viabilidade, semelhantes às observadas com o SFB.

Figura 2 - Viabilidade de células THP-1 em meio RPMI 1640 suplementado com infranadante ou soro fetal bovino em diferentes concentrações: (A) Infranadante; (B) Soro fetal bovino (SFB).

Com a confirmação de que as células se mantinham viáveis em cultivo com baixas concentrações de infranadante, avaliamos então se a adição das lipoproteínas às células poderia causar algum efeito citotóxico. Verificamos que as células THP-1

cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB (Figuras 3A a 3D) ou infranadante (Figuras 3E a 3H) e incubadas com 100 µg/mL das frações VLDL, LDL e HDL não apresentaram alterações morfológicas que indicassem citotoxicidade quando comparadas aos controles.

Figura 3 - Morfologia de células THP-1 em meio suplementado com 0,5% de SFB ou 0,5% de infranadante e adição de 100 µg/mL das frações de VLDL, LDL e HDL, após 72 h de incubação. Células suplementadas com SFB (A), adição de VLDL (B), LDL (C) e HDL (D). Células suplementadas com Infranadante (E), adição de VLDL (F), LDL (G) e HDL (H). As células foram coradas com corante panótico e visualizadas por Microscopia óptica (100x).

4.4 Padronização da infecção de células THP-1 com formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

Para a padronização da infecção das células THP-1 foram utilizadas as menores concentrações (0,5% e 1%) de SFB e infranadante, determinadas no teste de viabilidade celular, com um período de infecção de 8 h e duas proporções parasito:célula (5:1 e 8:1). Ao analisarmos o parasitismo após 24, 48 e 72 horas de incubação, podemos observar na Figura 4 que a proporção 8:1 apresentou maior parasitismo, quando comparada com a proporção 5:1 em ambas as concentrações de infranadante (Figuras 4A e 4B) e SFB (Figuras 4C e 4D) utilizadas.

Figura 4 - Parasitismo (média $\pm$ desvio padrão) de células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum*, nas proporções de parasito/célula de 5:1 e 8:1, com 8 h de infecção e diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 h) em meio RPMI 1640 suplementado com diferentes concentrações de infranadante ou SFB (A). 0,5% de infranadante (B) 1% de Infranadante. (C) 0,5% de SFB. (D) 1% de SFB.

Com o intuito de minimizarmos ao máximo a presença dos lípidos remanescentes no infranadante, a menor concentração (0,5%) foi escolhida nos experimentos posteriores. Utilizando a proporção parasito:célula de 8:1, um período de infecção menor (6h) foi testado sendo comparado às 8 h testadas previamente. Ao analisarmos o parasitismo após os períodos de incubação foi possível verificar que o número de amastigotas foi semelhante nos dois períodos de infecção, em ambas as concentrações de SFB (Figuras 5A e 5B) e infranadante (Figuras 5C e 5D) utilizadas.

Figura 5 - Parasitismo (média $\pm$ desvio padrão) de células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum*, nas proporções de parasito/célula de 8:1 por 6 h e 8 h de infecção e diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 h) em meio RPMI 1640 suplementado com 0,5% de SFB ou 0,5% de infranadante. (A) Infecção por 6 h. (B) Infecção por 8 h. (C) Infecção 6 h. (D) Infecção por 8 h. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* por 6 h ou 8 h em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante, sendo lavadas a seguir e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.5 Infecção das células THP-1 com *L. (L.) infantum* na presença das lipoproteínas

Uma vez que as condições de infecção das células THP-1 foram determinadas, a infecção utilizando diferentes concentrações das lipoproteínas foi realizada. Podemos observar que a adição da lipoproteína VLDL aumentou o parasitismo nas células infectadas com *L. (L.) infantum* (Figura 6). Esse aumento foi significativo na presença de todas as concentrações utilizadas após 24 (Figura 6B), 48 (Figura 6C) e 72 h (Figura 6D) de incubação, quando comparadas aos controles.

Figura 6 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito da lipoproteína VLDL em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* em diferentes períodos de infecção. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. (D) 72 h. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* por 6 horas em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante e suplementado com VLDL. Foram lavadas a seguir e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante sem VLDL. Resultado representativo de três experimentos independentes. *=P< 0,05 (Testes de ANOVA e Tukey).

A adição da lipoproteína HDL também aumentou o parasitismo nas células infectadas com *L. (L.) infantum*. Esse aumento foi significativo principalmente nos períodos de 0 h (Figura 7A), 24 h (Figura 7B) e 48 h (Figura 7C) quando as diferentes concentrações de HDL foram comparadas aos controles.

Figura 7 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito da lipoproteína HDL em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* em diferentes períodos de infecção. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. (D) 72 h. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* por 6 horas em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante e suplementado com HDL. Foram lavadas a seguir e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante sem HDL. Resultado representativo de três experimentos independentes. *=P< 0,05 (Testes de ANOVA e Tukey).

Quando a fração de LDL foi adicionada, ao compararmos o parasitismo das células infectadas na presença da lipoproteína com os controles, observamos um aumento significativo nos períodos 0 h e 24 horas de infecção (Figuras 8A e 8B), enquanto há diminuição significativa do parasitismo nos períodos de 48 e 72 h (Figuras 8C e D).

Figura 8 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito da lipoproteína LDL em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* em diferentes períodos de infecção. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. (D) 72 h. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* por 6 horas em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante e suplementado com LDL. Foram lavadas a seguir e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante sem LDL. Resultado representativo de três experimentos independentes. *=P< 0,05 (Testes de ANOVA e Tukey).

Como foi possível observar, houve aumento do parasitismo de células THP-1 na presença das frações de VLDL e HDL. Sendo assim, partimos para outra abordagem: analisar o efeito das duas frações quando colocadas juntas na cultura. Sabendo que a fração de HDL possui, em sua constituição, menor porção lipídica e maior porção proteica, colocamos uma concentração 10 vezes maior dessa fração quando comparada com a fração de VLDL, com a finalidade de competição entre as frações pelo receptor. A partir de então, fizemos uma padronização das concentrações que seriam utilizadas nesse experimento, testamos as concentrações de 10 e 100 µg/mL de VLDL e 100 e 1000 µg/mL de HDL. Comparando as diferenças estatísticas entre os grupos, foi possível perceber os resultados mais evidentes nas concentrações de 100 µg/mL de VLDL e 1000 µg/mL de HDL, assim definimos como as melhores concentrações a serem utilizadas.

Observamos aumento do parasitismo quando as frações VLDL e HDL foram adicionadas separadamente. Porém, quando as frações são coadicionadas, diminuem o parasitismo quando comparados ao controle nos três períodos de incubação (Figura 8).

Figura 9 - Parasitismo (mediana e percentis 25 – 75) sob efeito das lipoproteínas VLDL e HDL em diferentes concentrações (100 e 1000 µg/mL) nas células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* em diferentes períodos de infecção. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. (D) 72 h. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* por 6 horas em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante e suplementado com VLDL e/ou HDL. Foram lavadas a seguir e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 com 0,5% de infranadante sem VLDL e/ou HDL. Resultado representativo de três experimentos independentes. *=P< 0,05 (Testes de ANOVA e Tukey).

Como observamos um aumento do parasitismo com o tempo, verificamos a proliferação dos parasitos após 24 e 48 h de incubação em relação ao parasitismo das células no tempo 0 de cultura. O parasitismo nas células sem adição das frações lipoproteicas, após 24 h, apresentou aumento de mais ou menos duas vezes (Figura 10A), enquanto esse aumento foi de quatro vezes no período de 48 h (Figura 10B). Com a adição de VLDL, o aumento do parasitismo foi menor que uma vez com 24 h de incubação, sendo maior que uma vez com 48 h. Já a adição de HDL e das duas frações juntas (VLDL+HDL) resultaram em aumento de duas vezes no período de 24 h e de três vezes no período de 48 h quando comparados às do tempo 0 de cultura.

Figura 10 - Razão do parasitismo em diferentes tempos em relação de células THP-1 infectadas com promastigotas de *L. (L.) infantum* na presença ou ausência das frações de VLDL e HDL. A razão foi determinada por meio do parasitismo no período de 24 h (Figura 10A) e 48 h (Figura 10B) em relação ao período de 0 h.

4.6 Atividade da arginase nas células THP-1 infectadas por promastigotas de *L. (L.) infantum* na presença das lipoproteínas

Uma vez que houve modificação no parasitismo das células THP-1 quando as lipoproteínas foram adicionadas, alguns mecanismos que possam estar envolvidos foram investigados, como a atividade da arginase. Ao compararmos a atividade da arginase entre as células não infectadas com as células infectadas na presença das lipoproteínas, pode-se observar um aumento no período de 24 h (Figura 11B), quando as frações HDL e VLDL+HDL foram adicionadas. Esse aumento fica mais evidente após o período de 48 h (Figura 11C).

Figura 11 - Atividade da arginase em células THP-1 sem ou com infecção por promastigotas de *L. (L.) infantum*, na ausência ou presença das frações de VLDL e HDL. A atividade da arginase foi medida como concentração de ureia nos períodos de 0 h (Figura A), 24 h (Figura B) e 48 h (Figura C). Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.7 Expressão do mRNA de IGF-I e seu receptor nas células THP-1 infectadas na presença das lipoproteínas

Além da arginase, a expressão do mRNA de IGF-I e seu receptor também foi investigada. Podemos verificar na Figura 14, que a expressão do mRNA de IGF-I apresenta-se diminuída nas células infectadas, na presença ou não das lipoproteínas, quando comparada com as células não-infectadas. Ao analisarmos a expressão no tempo 0 h de infecção (Figura 12A), verificamos um aumento na expressão de mRNA de IGF-I nas células infectadas na presença das lipoproteínas HDL e VLDL+HDL em relação às células infectadas. No entanto, esse aumento não é verificado nos tempos de 24 h (Figura 12B) e 48 h (Figura 12C).

Figura 12 - Expressão de mRNA de IGF-I em células THP-1 infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum* com ou sem adição de lipoproteínas VLDL e HDL em diferentes tempos de infecção. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. Expressão de mRNA de IGF-I em relação a expressão de mRNA de β-actina. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Em relação à expressão do mRNA do receptor de IGF-I, a sua diminuição pode ser observada principalmente nas células infectadas na presença das lipoproteínas (Figura 15). No tempo 0 h (Figura 15A), a diminuição da expressão é mais evidente quando as frações VLDL e VLDL+HDL foram adicionadas. Já no tempo 24 h (Figura 15B) e 48 h (Figura 15C), verificamos uma diminuição na expressão quando as frações VLDL e HDL foram adicionadas separadamente ou em conjunto.

Figura 13 - Expressão de mRNA de IGF-IR em células THP-1 infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum* com ou sem adição de lipoproteínas VLDL e HDL em diferentes tempos de infecção. (A) 0 h. (B) 24 h. (C) 48 h. Expressão de mRNA de IGF-IR em relação a expressão de mRNA de β -actina. Resultado representativo de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a influência das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de células THP-1 infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Para realizar essas avaliações, consideramos inicialmente a necessidade de um substituto ao soro fetal bovino (SFB) utilizado nas culturas de células, pois na composição desse soro fazem parte as diferentes frações de lipoproteínas. Apesar de existir no mercado soros delipidados, optamos por utilizar o infranadante resultante do processo de fracionamento de lipoproteínas em nossos experimentos.

A obtenção das frações de lipoproteínas se faz por ultracentrifugações sequenciais utilizando gradientes diferentes (53), isolando-se a cada etapa as diferentes frações de lipoproteínas. No final desse processo, resta o infranadante que, teoricamente, estaria livre de frações lipoproteicas. De fato, constatamos que o infranadante era, praticamente, desprovido de lipoproteínas.

Dessa forma, antes da padronização da infecção, padronizamos a concentração de infranadante a ser utilizada nas culturas de células THP-1. Embora a concentração de proteínas no infranadante estivesse próxima ao de soro total, foi necessário fazer um ajuste da concentração de infranadante para suplementação de células THP-1 para garantir um meio apropriado para o crescimento celular sem interferir na viabilidade das células. De uma forma geral foi possível observar que as células THP-1, quando suplementadas com baixas concentrações tanto de infranadante quanto de SFB, apresentaram boa viabilidade celular. No entanto, observamos que o crescimento e a viabilidade celular se apresentaram de formas distintas ao compararmos o SFB com o infranadante. Foi possível perceber que no período de 72 h as células suplementadas com infranadante apresentavam uma diminuição no seu crescimento e viabilidade celular quando comparamos com SFB. Por este motivo, de todas as concentrações testadas optamos por utilizar a concentração de 0,5% de infranadante, que consequentemente teria a menor concentração remanescente de lipoproteínas possível, além de apresentar maior semelhança de crescimento e viabilidade celular comparáveis aos das células suplementadas com SFB.

As alterações lipídicas envolvendo as frações de VLDL e HDL têm sido observadas em estudos de LV humana, como por exemplo, Bertoli et al. (23), que observaram hipertrigliceridemia em 28 pacientes com LV. No estudo de Bekaert et al. (24) também foram observadas diminuições nos níveis plasmáticos de HDL. Esses perfis foram observados tanto em cães com aumento significativo dos níveis de colesterol total, VLDL e LDL, e diminuição dos níveis de HDL (29), como em modelos experimentais, onde soro de hamsteres apresentaram um aumento de triglicérides, após 60 dias de infecção por *Leishmania donovani* (30).

Também em um estudo realizado pelo nosso grupo envolvendo pacientes com LV, foi possível observar que pacientes com LV apresentaram níveis séricos reduzidos da lipoproteína HDL, aumento da lipoproteína VLDL e também de triglicérides (58). Neste estudo observaram-se que a redução nas concentrações séricas de HDL e aumento de níveis de VLDL poderiam estar relacionados com a progressão para a doença. Com base nesses dados da literatura, no presente estudo, avaliamos o efeito das frações VLDL e HDL na interação de macrófago THP-1 e *L. (L.) infantum*.

No presente estudo, na avaliação dos efeitos das frações lipoproteicas na infecção por *L. (L.) infantum* utilizando células THP-1 e infranadante para o enriquecimento do meio de cultura, observamos um aumento do parasitismo quando as frações de VLDL e HDL foram adicionadas separadamente. Frente a esses resultados, vale relembrar que o perfil descrito em pacientes com LV é de redução nos níveis de HDL e aumento nos níveis de VLDL. Se encontramos que a adição de HDL aumenta o parasitismo, esses níveis baixos de HDL em pacientes, teoricamente, favoreceriam o controle da infecção. No entanto, o prosseguimento dos nossos experimentos mostrou uma complexidade maior dessa interação.

Quando as frações VLDL e HDL foram adicionadas concomitantemente na infecção de células THP-1, houve uma diminuição significativa do parasitismo quando comparamos com a cultura isenta das frações. Resultado similar fora observado no trabalho de Carvalho et al. (57), onde houve aumento do parasitismo em 29% quando macrófagos foram incubados por 6 h com a fração de VLDL quando comparado à cultura sem adição da lipoproteína, mas a coadição de HDL reduziu significativamente (37%) o parasitismo quando comparado com VLDL.

Que mecanismo de controle do parasitismo poderia estar sendo modulado pela adição de VLDL e HDL concomitantemente? No macrófago, os produtos de metabolismo de L-arginina são importantes tanto para a destruição quanto proliferação de *Leishmania*. Os macrófagos dependem da expressão de duas enzimas que metabolizam a L-arginina, a sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) e a arginase que podem resultar, respectivamente, na morte ou crescimento dos parasitos (59). A ativação dessas enzimas é induzida, entre outros fatores, por citocinas. As citocinas Th1 induzem os macrófagos a produzirem peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, este último com a ativação da iNOS, responsáveis pela morte do parasita (31). Em contraste, as citocinas Th2 podem induzir a atividade da arginase, que hidrolisa a L-arginina em ornitina, que é fonte essencial para a síntese de poliaminas, favorecendo o crescimento dos parasitos (60). Visto que a arginase pode desempenhar um papel importante na proliferação dos parasitas, avaliamos também sua atividade e possível influência no parasitismo de células THP-1. Os resultados obtidos foram contrários ao esperado, já que houve um aumento da atividade da arginase no grupo com adição de VLDL e HDL concomitante, onde observamos diminuição do parasitismo, ao compararmos aos grupos onde as frações foram adicionadas separadamente. Esse dado, aparentemente controverso, pode ter explicação num estudo desenvolvido por Laranjeira-Silva et al. (61) que demonstraram que macrófagos tratados com melatonina sofreram uma forte redução da expressão de CAT-2B (“*cationic amino acid transporter - 2B*”), o transportador de arginina mais relevante nos macrófagos (62). A redução da expressão de CAT-2B comprometeria a captação de arginina, diminuindo assim a disponibilidade de poliaminas para a proliferação de *Leishmania*. Nossos resultados podem estar relacionados com esse mecanismo onde ocorre a redução de CAT-2B, que leva a diminuição da disponibilidade de poliaminas para a proliferação dos parasitas. De alguma forma, a adição concomitante de VLDL e HDL levaria à redução da expressão de CAT-2B?

Avaliamos ainda outro possível fator que poderia explicar esse achado. Nosso grupo realizou diversos trabalhos anteriormente analisando a participação do IGF-I na infecção por *Leishmania*, que possui efeito indutor da proliferação do parasito e progressão da infecção, interferindo na produção de óxido nítrico e arginase por

macrófagos (51); (63); (64). Diante disso avaliamos também a expressão do mRNA de IGF-I e seu receptor. Esses fatores poderiam explicar os perfis de aumento e/ou diminuição do parasitismo obtido em nossos resultados. Foi possível observar uma diminuição da expressão do mRNA de IGF-1 de todos os grupos de células infectadas na presença ou ausência das frações, quando comparamos ao controle de células não infectadas. A mesma diminuição da expressão do mRNA de IGF-IR foi observada nos períodos 0 h e 24 h em todos os grupos de células infectadas com ou sem a adição das frações, quando comparados ao controle de célula não infectada. Vale ressaltar que a presença das frações não parece interferir de forma importante na expressão do mRNA de IGF-I, uma vez que o perfil de diminuição da expressão foi visto também na infecção de células THP-1 na ausência das frações. Quando analisamos a expressão do mRNA de IGF-IR, observamos também uma diminuição na sua expressão quando comparados com a célula infectada ou não na ausência das frações. Um trabalho realizado pelo nosso grupo utilizando células de linhagem tumoral (RAW 264.7) infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) major* também apresentou redução da expressão do mRNA de IGF-I, bem como do parasitismo, quando comparadas ao controle de células não infectadas (65).

As lipoproteínas plasmáticas, com base nos dados obtidos no presente estudo, sugerem apresentar um importante efeito na infecção de THP-1 por *Leishmania (L.) infantum*. No entanto, um aprofundamento maior nos mecanismos envolvidos nessa interação se faz necessário.

6 CONCLUSÕES

- a) Células THP-1 infectadas com *L. (L.) infantum* na presença das frações de VLDL e HDL apresentaram aumento do parasitismo quando comparadas ao controle de células infectadas na ausência das frações;
- b) Células THP-1 infectadas com *L. (L.) infantum* na presença concomitante das frações de VLDL e HDL apresentaram diminuição do parasitismo quando comparadas ao controle de células infectadas na ausência das frações;
- c) A atividade da arginase de células infectas aumentou na presença concomitante das frações de VLDL e HDL quando comparadas as células infectadas na ausência das frações;
- d) A expressão do mRNA de IGF-I e seu receptor diminuiu em células infectadas na presença e ausência das lipoproteínas;
- e) Nossos estudos sugerem que as lipoproteínas plasmáticas exercem um papel importante no parasitismo de células THP-1, que podem estar relacionados à via metabólica da arginina.

REFERENCIAS

1. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert review of anti-infective therapy. 2010 Apr;8(4):419-33.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. 2012; PLoS ONE 7(5).
3. Saúde Md. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2006.
4. World Health Organization. Control of the leishmaniasis report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. 2010.
5. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. 1987;1.
6. Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitology 2001;393-403.
7. Dias R. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004;99:481-7.
8. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in dermatology. 1999;17:279-89.
9. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2006;3:151-6.
10. Myler PJ, Fasel N. Leishmaniasis: epidemiological trends and diagnosis. Leishmania after the genome. 2008;1-14.
11. Bekaert ED, Dubois DY, Bouma ME, Lontie JF, Kallel R, Malmendier CL, Ayrault-Jarrier M. Alterations in lipoprotein density classes in infantile visceral leishmaniasis: presence of apolipoprotein SAA European Journal of Clinical Investigation. 1992;22:190-9.
12. Lindoso JAL, Goto H. Leishmaniose Visceral. In: Antonio Carlos Lopes. (Org.) Tratado de Clínica Médica. Guanabara Koogan Ltda. 2016;3.
13. Rader DJ, Wilson JM. . Gene therapy for lipid disorders. Molecular cardiovascular medicine New York: Scientific american. 1995:97-114.
14. Hoeg JM, Brewer HB. Human lipoprotein metabolism and the liver. Progress in liver diseases. 1986;8:51-64.
15. Hu L, Hoogt CC van der, Espirito Santo SM, Out R, Kypreos KE, van Vlijmen BJ, et al. The hepatic uptake of VLDL in lrp-ldlr--vldlr-- mice is regulated by LPL activity and involves proteoglycans and SR-BI. J Lipid Res. 2008;49(7):1553-61.
16. Kindel T, Lee DM, Tso P. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. Atheroscler Suppl. 2010;11:6-11.
17. Kruth HS. The fate of lipoprotein cholesterol entering the arterial wall. Curr Opin Lipidol 1997;8(5):246-52.
18. Gotto JR, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. Methods in Enzymology. 1986;128:3-41.

19. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications of cholesterol deposition in atherosclerosis *Annual Review of Biochemistry*. 2083;52:223-61.
20. Messora LB. Influência dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e no hemograma de camundongos Knockout para o gene do receptor de LDL (LDLr-/-). Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS. 2010.
21. Donma MM, Orkide D. Apolipoproteins: Biochemistry, methods and clinical significance. *Biochemical Education*. 1989;17:63-8.
22. Franceschini G. Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. *European Journal of Clinical Investigation*. 1996;26:733-46.
23. Olivecrona T, Gunilla O. The ins and outs of adipose tissue. *Ehnholm C*, editor. 2009;315-69.
24. Bagavscpgal V. Visceral leishmaniasis presenting with hypertriglyceridaemia. *Lancet*. 1982;2:504-5.
25. Bekaert ED, Kallel R, Bouma M-E, Lontie J-F, Mebazaa A, Malmendier CL, Ayrault-Jarrier M. Plasma lipoproteins in infantile visceral leishmaniasis: deficiency of apolipoproteins A-I and A-II. *Clinica Chimica Acta*. 1989;184:181-91.
26. Liberopoulos E, Alexandridis G, Bairaktari E, Elisaf M. Severe hypocholesterolemia with reduced serum lipoprotein (a) in a patient with visceral leishmaniasis. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32(3):305-8.
27. Seçmeer G, Cengiz A, Gürgey A, Kara A, Cultu O, Tavil B, Devrim I. Hypertriglyceridemia and Decreased High-density Lipoprotein Could be a Clue for Visceral Leishmaniasis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2006;14:401-2.
28. Soares NM, Leal TF, Fiúza MC, Reis EA, Souza MA, Dos Santos, Pontes-De-Carvalho L. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on Leishmania-infected macrophages. *Parasite Immunology*. 2010;32:259-66.
29. Nieto CG, Barrera R, Habela MA, Navarrete I, Molina C, Jiménez A, Serrera JL. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 1992;44(3-4):175-82. Pubmed Central PMCID: 1466128.
30. Durgut R, Dalkılıç D, GÜZEL M. Evaluation of te serum lipid profiles in dogs with symptomatic visceral leishmaniasis. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2012.
31. Vasconcelos RC, Urago KP, Bunn-Moreno MM, Madeira ED. Suppressor activity in *Leshmania donovani*-infected hamster serum: reversion by delipidated bovine serum albumin and role in cell cycle events. *Journal of Medical and Biological Research*. 1996;29:615-22.
32. Rittig MG, Bogdan C. Leishmania–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative views. *Parasitology Today*. 2000;16(7).
33. Girona J, La Ville AE, Heras M, Olivé S, Masana L. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF-alpha secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:658-67.
34. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. 1979;76:333-7.

35. Krieger M. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry*. 1994;63:601-37.
36. Han R. Plasma lipoproteins are important components of the immune system. *Microbiol Immunol*. 2010;54(4):246-53.
37. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 2004;45(7):1169-96.
38. Shiflett AM, Bishop JR, Pahwa A, Hajduk SL. Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005 Set, 23;280(38):32578-85.
39. Samanovic M, Moline-Portela MP, Chessler ADC, Burleigh BA, Raper J. Trypanosome Lytic Factor, an Antimicrobial High-Density Lipoprotein, Ameliorates Leishmania Infection. *Plos Pathogens*. 2009;5.
40. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implications in leishmaniasis. *Molecular Biochem Parasitol* 2004;133(2):145-52.
41. Rosenzweig D, Smith D, Oppender F.; Stern, S, Olafson, RW, Zilberstein D. Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *The FASEB Journal*. 2008;22:590-602.
42. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JBJr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology*. 1990;144:278-83.
43. Haidaris CG, Bonventure PF. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of Leishmania donovani tissue forms by activated macrophages. 1982;129(2):850-5.
44. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990 Jun-15;15(144):4794-7.
45. Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. Trypanosoma spp., Leishmania spp. and Leptomonas spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Experimental parasitology*. 1978;46:141-4. Pubmed Central PMCID: 569593.
46. Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. *J Biol Chem* 2004;279:23668-78.
47. Wang WW, Jenkinson JC, Griscavage JM, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995 25 May 210(3):1009-16.
48. Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Cysal RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;82(5):1685-93.
49. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *The FEBS Journal*. 1990;190:445-62.
50. Goto H, Gomes CMC, Corbett CER, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for Leishmania promastigotes. *Acta tropica*. 1997 15 April 15(64):225-8.

51. Goto H, Gomes CMC, Corbett CER, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor-I induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *Eukaryotic Microbiology* 1998 May 1998;45(3):325-55.
52. Goto H, Gomes CMC, Corbett CER, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 October 1998;95(22):13211-6.
53. Daigneault M, Peterson LA, Marriott HM, Whyte M, Dockrell DH The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*. 2010;5(1).
54. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34(9):1345-53.
55. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;7(72):248-54.
56. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunol Methods*. 1994;174:231-5.
57. Pfaffl MW, Lange IG, Daxenberger A, Meyer HH. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS*. 2001;109(5):345-55.
58. Carvalho MDT, Alonso DP, Vendrame CMV, Costa DL, Costa GHN, Werneck GL, Ribolla PEM, Goto H. Lipoprotein Lipase and PPAR Alpha Gene Polymorphisms, Increased Very-Low-Density Lipoprotein Levels, and Decreased High-Density Lipoprotein Levels as Risk Markers for the Development of Visceral Leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Mediators Inflamm*. 2014 Aug, 27;2014.
59. Munder M. Role of arginase in asthma: potential clinical applications. *Expert Review Clinical Pharmacology*. 2010;3(1).
60. Munder M, Choi BS, Rogers M, Kropf P. L-arginine deprivation impairs *Leishmania* major-specific T-cell responses. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2161-70.
61. Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Floeter-Winter LM, Markus RP. Melatonin attenuates *Leishmania (L.) amazonensis* infection by modulating arginine metabolism. *Journal of Pineal Research* 2015 November 2015;59(4):478-87.
62. Wanasen N, MacLeod C, Ellies LG, Soong L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infection and Immunity*. 2007;75(6):2802-10.
63. Gomes CM, Goto H, Ribeiro Da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000;81(4):249-55.
64. Vendrame CM, Carvalho MD, Rios FJ, Manuli ER, Petitto-Assis F, Goto H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand J Immunol* 2007 Aug/Sep 2007;66(2-3):287-96.

65. Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Goto H. The interactions and essential effects of intrinsic insulin-like growth factor-I on *Leishmania* (*Leishmania*) major growth within macrophages. *Parasite Immunol.* 2013;35(7-8):239-44.

ANEXO

**ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso dos Animais do
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 28 de Janeiro de 2014

Ilmo(a)
Dr. Hiro Goto
(aos cuidados de Alline Martins Rodrigues Santos)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/258 'Efeito das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de célula monocítica humana infectada com Leishmania (Leishmania) infantum'**, sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP